

准噶尔小胸鼈甲短时低温胁迫响应的转录组分析

库尔班·吐松, 陆雪莹, 刘小宁, 马 纪*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要:【目的】拟步甲科昆虫小胸鼈甲 *Microdera punctipennis* 是分布于中国新疆古尔班通古特沙漠的特有物种, 具有很强的耐寒性, 但其低温响应的分子机制尚不明确。本研究旨在利用转录组测序技术丰富小胸鼈甲的已知基因信息, 分析在短时低温胁迫下, 上调表达基因的主要类群及参与的主要代谢通路。【方法】利用 Trinity 软件对分别在 4℃ 低温和 25℃ (对照) 下处理 3 h 的小胸鼈甲成虫 RNA-Seq 数据进行从头组装, 利用 Blast2go 软件进行基因注释。通过 DESeq 和 GFOLD 软件分析差异表达基因, 并对上调表达基因进行 GO (Gene Ontology) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 代谢途径富集分析。【结果】测序过滤后得到 68 165 001 个有效读序, 51 712 个平均长度为 984 bp 的非冗余基因, 其中 29 925 个基因 (约 57.87%) 有同源序列 ($E\text{-value} < 10^{-5}$), 与拟步甲科的赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 相应基因相似性最高 (核苷酸序列一致性为 72.75%)。低温响应上调表达基因有 514 个, 富集到 35 个 GO 类群, 18 个 KEGG 途径。其中胁迫响应类群、生物调节类群和免疫系统过程类群都占有重要比例, 嘌呤代谢、硫胺素代谢、糖酵解/糖异生等代谢通路显著富集。在胁迫响应类群中, 热激蛋白 Hsp90 基因、超氧化物歧化酶 (SOD) 基因和钙联接蛋白 Calnexin 基因等 8 个非生物胁迫相关基因显著上调表达。【结论】荒漠昆虫小胸鼈甲低温转录组揭示, 在 4℃ 冷驯化过程中, 代谢过程、胁迫响应、生物调节和免疫系统等生物学过程相关基因表达显著上调, 其中几个非生物胁迫响应基因提示小胸鼈甲可能从分子伴侣、细胞周期阻滞、线粒体稳定性、抗氧化胁迫等多方面应对低温胁迫。KEGG 富集分析所揭示的小胸鼈甲在低温下的转录组代谢通路与其他物种有较大差异。研究结果为后续生物信息学分析及小胸鼈甲耐寒关键基因的发掘及耐寒机制的揭示提供了基础数据。

关键词: 小胸鼈甲; 低温胁迫; 冷驯化; 转录组; 差异基因

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2016)06-0581-11

Transcriptomic analysis of the desert beetle *Microdera punctipennis* (Coleoptera: Tenebrionidae) in response to short-term cold stress

Kuerban TUSONG, LU Xue-Ying, LIU Xiao-Ning, MA Ji* (Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: 【Aim】Tenebrionid insect *Microdera punctipennis* is an endemic species in Gurbantünggüt Desert, Xinjiang, China. It has very strong cold hardiness, but the molecular mechanisms by which *M. punctipennis* responses to low temperature are still unclear. This study aims to enrich the genetic information of *M. punctipennis*, and to analyze the functional groups of the most up-regulated genes under short-term cold stress and the pathways which they may involve in. 【Methods】Transcriptomic sequencing

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31360527)

作者简介: 库尔班·吐松, 男, 1983 年生, 新疆温宿县人, 博士研究生, 研究方向为昆虫低温分子生物学, E-mail: kurban910@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: majiuci@xju.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-03-14; 接受日期 Accepted: 2016-05-24

reads from *M. punctipennis* adults exposed to 4°C as low temperature treatment and 25°C as the control, respectively, for 3 h were *de novo* assembled by using Trinity software. Gene annotation was conducted by using Blast2go software. The differentially expressed genes were screened by using DESeq and GFOLD softwares. For the up-regulated genes, GO term enrichment and KEGG metabolic pathway analysis were performed using Blast2go software. 【Results】 In total, 51 712 non-redundant transcripts with the average length of 984 bp were assembled, of which the expression levels of 514 genes were up-regulated and 91 genes down-regulated in response to cold stress. The up-regulated ones were enriched to 35 GO terms and 18 KEGG pathways, showing that stress-related GO terms, biological regulation and immune system are enriched significantly. Pathways such as purine metabolism, thiamine metabolism, and glycolysis/gluconeogenesis are significantly enriched. In the stress responsive GO term, the expression levels of eight abiotic related genes, including heat shock protein (Hsp90) gene, superoxide dismutase (SOD) gene, calnexin gene, *etc.*, were up-regulated significantly. 【Conclusion】 The transcriptomic data of the desert beetle *M. punctipennis* reveal that the expressions of genes related to the biological processes like metabolic process, stress response, biological regulation and immune system are significantly up-regulated during cold acclimation at 4°C. The metabolic pathways revealed by KEGG enrichment show that low temperature transcriptome of *M. punctipennis* is much different from those of other species. Our results provide basic data for successive bioinformatics analysis and mining the key genes in cold tolerance for *M. punctipennis* as well as for elucidation of the related molecular mechanisms.

Key words: *Microdera punctipennis*; low temperature stress; cold acclimation; transcriptome; differentially expressed genes

昆虫占地球动物种类的 75% 以上,存在于几乎所有的生态系统中,并发挥着重要的生态作用 (Chown and Nicolson, 2004; Harrison *et al.*, 2012; MacMillan *et al.*, 2015)。温度通过约束昆虫的地理分布和季节性活动 (Harrison *et al.*, 2012),直接或间接地影响昆虫的扩散和侵害性、天敌昆虫引入的成功性,及原生昆虫种群的动态性 (Bale and Hayward, 2010)。极地和高山地区的大部分昆虫能够适应低温及冬季的环境胁迫而生存 (Leather *et al.*, 1993),荒漠昆虫也经常遭遇潜在的致命寒冷气候 (Sømme, 1995)。因此,低温生物学是昆虫适应性的重要组成部分,也是昆虫分布的重要决定因素之一 (Andersen *et al.*, 2015)。

在低温条件下,昆虫会发生一系列生理生化改变 (Denlinger and Lee, 2010)。近年来,从基因转录组水平研究昆虫对低温的适应机制进展迅速。例如,利用抑制消减杂交技术 (SSH) 研究尖音库蚊 *Culex pipiens* 冬季滞育成虫 (Robich *et al.*, 2007)、分析冷驯化及冷休克复苏后的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 转录组 (Denlinger and Lee, 2010) 以及红尾肉蝇 *Sarcophaga crassipalpis* 转录组 (Rinehart *et al.*, 2007),发现了几个与冷应激相关的基因上调表达。利用基因芯片技术分析 0°C 处理 2 h 并复苏 30

min 的果蝇,发现膜蛋白、胁迫响应蛋白和线粒体蛋白均有差异表达; -0.5°C 处理不同时间的果蝇转录组,基因的表达有很大差异 (Qin *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011)。分析麻蝇 *Sarcophaga bullata* 的低温转录组,发现快速冷驯化对其转录组表达谱的影响不大 (Teets *et al.*, 2012)。

RNA-Seq 技术的广泛运用,极大地促进了非模式生物的功能基因组分析,例如对竹节虫 *Micrarchus* sp.、小蠹 *Tomicus yunnanensis* 和瓢虫 *Cryptolaemus montrouzieri* (Zhu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Dunning *et al.*, 2013) 的转录组研究。对白蜡虫 *Ericerus pela* 的过冷却点转录组研究发现 1 124 条基因上调表达,1 262 条基因下调表达,这些差异性表达基因分别富集到蔗糖代谢、半乳糖代谢、多种氨基酸代谢等途径 (Yu *et al.*, 2016)。

小胸鳖甲 *Microdera punctipennis* (鞘翅目:拟步甲科) 是分布于新疆古尔班通古特沙漠的特有物种 (黄人鑫等, 2005)。该地区冬季最低气温可降至 -41.5°C (Zhou *et al.*, 2009)。小胸鳖甲依靠昼伏夜出来躲避干旱和高温,并大量合成抗冻蛋白过冬,其成虫的过冷却点在冬季可低至 -19.6°C (Hou *et al.*, 2010),其耐受荒漠极端环境的潜在分子机制还需从基因转录组水平进行深入研究。之前我们利用

RNA-Seq 技术 Illumina Solexa 平台对 4℃ 低温短时胁迫及 25℃ 对照组的小胸鳖甲成虫进行了转录组测序, 由于拼接组装获得 144 777 条基因 (Lu *et al.*, 2014b), 显著多于已报道的昆虫转录组数据, 可能存在大量冗余转录本, 故本研究对测序数据进行了重新组装, 共获得 51 712 条基因, 有效地剔除了冗余转录本, 并对 4℃ 低温上调差异表达基因进行了功能分类, 以期发掘与小胸鳖甲低温适应机制相关的关键基因和低温相关的代谢通路, 为从分子水平开展小胸鳖甲低温适应机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试虫来源及处理

小胸鳖甲成虫于 2011 年 10 月 2 日采自新疆古尔班通古特沙漠边缘地带 (44°24'N, 87°51'E, 海拔 444 m), 在室内 25℃ 饲养一周后选取个体大小相近的 10 头成虫用于实验, 随机将 5 头成虫置于 4℃ 作为处理组, 剩余 5 头置于 25℃ 作为对照组, 处理 3 h 后迅速将处理组和对照组试虫置于液氮中, 再转移至 -80℃ 冰箱以备 RNA 提取。

1.2 cDNA 文库构建和 Illumina 测序

从两组冻存的小胸鳖甲试虫中各随机取出 3 头, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA。总 RNA 的提取、质量分析、cDNA 文库的建立及测序工作由生工生物工程 (上海) 有限公司完成。采用 Illumina HiSeq™ 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA) 系统进行测序。

1.3 序列拼接及冗余转录本去除

利用 Neson tools 程序对原始测序数据进行质量预处理。质量阈值为 20 (最大错误率 1%), 长度阈值为 24 bp, 切除读序中含 N 的部分。使用 Trinity v2.0.6 对得到的有效读序 (clean reads) 进行 paired-end 拼接。由于利用 Trinity 组装过程中会存在单核苷酸多态性和一些小插入或者缺失所造成的冗余 (Wang *et al.*, 2013), 故使用 CD-HIT-EST 软件删除完全被长转录本覆盖且一致性 (identity) 高于 99% 的短冗余转录本 (基因), 得到非冗余基因。

1.4 生物信息学分析

使用 Blast2go 软件将拼接得到的非冗余基因与 NCBI 的 NR 蛋白质数据库 (最后升级时间 2015 年 5 月) 进行 BLASTX 注释 (E-value < 10^{-5}); 通过 go mapping, go annotation, interpro scan 和 merging of interpro GOs to annotation 等步骤寻找与某些结构域特征序列同源的基因进行 GO (gene ontology) 注

释, 并进行 GO term 富集分析。利用 GO 数据库提供的 GO-Enzyme Code 文件和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库提供的代谢通路信息, 对参与代谢通路的序列的富集程度进行分类。

1.5 小胸鳖甲低温转录组差异表达分析

利用 Bowtie2 软件对有效读序和非冗余基因进行 mapping, 得到 alignment 文件 (Sam file), 通过 samtools 处理得到各转录本在不同处理条件下的读数 (readcount)。把 readcount 文件作为收入文件, 在 R 环境使用 bioconductor 的 DESeq 工具分析低温处理数据的差异表达转录本, 将错误发现率 (false discovery rate, FDR) 分别设为小于 0.05 和 0.1, 获得差异表达基因的倍数均 ≥ 3.6 以此为基础, 将差异表达倍数 4 设为阈值, 利用 GFOLD 软件 (Feng *et al.*, 2012) 对小胸鳖甲转录组数据再次进行差异表达分析。取两种方法的并集作为筛选出的差异表达基因。

2 结果

2.1 低水平读序的去除及从头组装结果

对 4℃ 处理组和 25℃ 对照组小胸鳖甲成虫 cDNA 文库采用 Illumina HiSeq™ 2000 测序, 共获得 84 944 120 条原始读序, 经过质量预处理后最终获得平均长度为 80.6 bp 的有效读序 68 165 001 条。利用 Trinity v2.0.6 对有效读序进行组装, 初步得到 56 130 条基因, 去除冗余序列后最终得到 51 712 条非冗余基因 (表 1), 可对转录组质量进行评价。

2.2 功能注释及序列特征

将全部 51 712 个基因与 NR 数据库进行序列同源性比对, 共有 29 925 个 (占 57.87%) 基因与其他生物的已知蛋白具有不同程度的同源性。在已注释序列中, 完全匹配的有 7 265 个 (E-value = 0), 占注释序列的 24.28%; 高度匹配 (E-value < $1.0E-50$) 的有 9 495 个 (占 31.73%); 其余 13 161 个 (占 43.98%) E 值为 $1.0E-50 \sim 1.0E-5$ (图 1: A)。

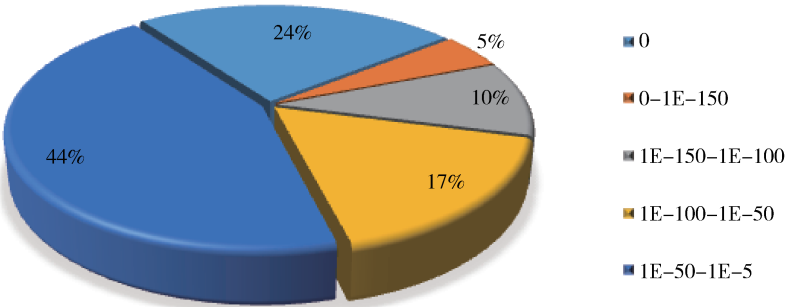
从所注释到的物种分布来看, 有 21 769 个 (占 72.75%) 基因与拟步甲科模式昆虫赤拟谷盗 *T. castaneum* 同源; 2 182 个 (占 7.29%) 基因与节肢动物寄生虫 *Gregarina niphandrodes* 同源; 360 个 (占 1.2%) 基因与中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* 同源; 237 个 (占 0.79%) 基因与黄粉虫 *Tenebrio molitor* 同源, 与其他物种同源的基因均少于 200 个 (图 1: B)。

表 1 小胸鳖甲转录组测序结果和从头组装结果统计

Table 1	Statistics of the sequencing results and <i>de novo</i> assembly of <i>Microdera punctipennis</i> tanscriptome		
	低温处理组 Cold treatment group	对照组 Control group	合计 Total
读序 Reads			
总原始读序 Total raw reads	36 786 116	48 158 004	84 944 120
原始读序平均长度 Average input length (nt)	100	100	
有效读序平均长度 Average output length (nt)	79.53	81.7	
总有效读序 Total clean reads	29 066 064	39 098 937	68 165 001
有效读序 Q20 百分比 Q20 percentage	79.01%	81.19%	
组装基因 Assembled unigenes			
总数 Total number	39 712	42 409	56 130
非冗余基因 Filtered unigenes			
总数 Total number	37 086	40 032	51 712
最长基因 Maximum length (nt)	27 511	12 194	30 733
最短基因 Minimum length (nt)	224	224	224
平均长度 Average length (nt)	1 014.54	1 047.8	983.83
中位长度 Median length (nt)	537	574	505
GC 百分比 GC percentage	42.78%	42.14%	41.96%
N50 (nt)	1 767	1 821	1 755

N50: 将基因从长到短排序,依次累加基因的碱基数,当累加的碱基数达到总碱基数 50% 时最后一个加上的基因的长度 Length of the last added gene when the accumulated base length reached 50% of the total base length by sorting all genes from the largest to the smallest and accumulating the base numbers of the genes in turn.

A



B

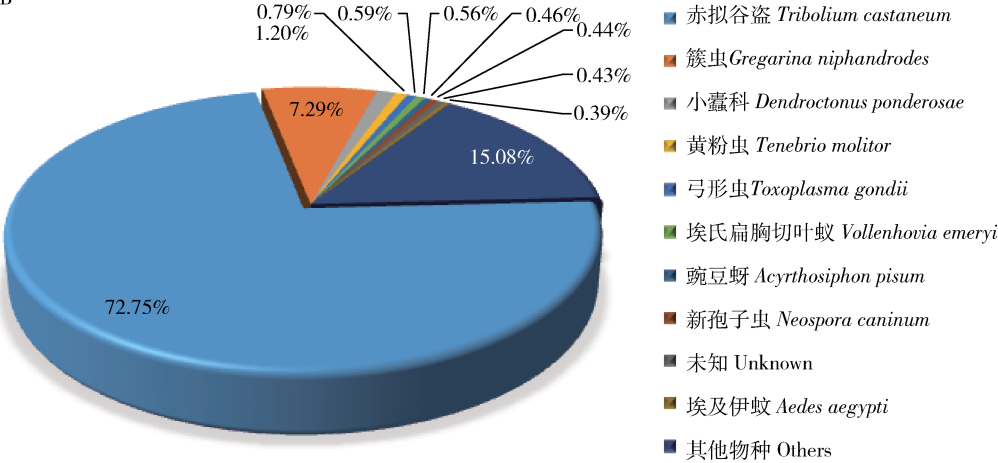


图 1 小胸鳖甲转录组基因与 NCBI 的 NR 数据库比对结果

Fig. 1 Alignment of the unigenes from *Microdera punctipennis* transcriptome against NCBI non-redundant protein sequence database A; E 值分布 E-value distribution. 每个基因在 NR 库中比对得到的最小 E 值序列为同源序列 (E-value <1.0E-5)。The sequence of the smallest E-value for each unigenes is represented as the homolog (E-value <1.0E-5). B; 同源序列物种分布 Species distribution of unigenes homologs. 图中标注出每个物种所占比例。Percentage of species distribution is marked on the chart.

2.3 小胸鳖甲转录组响应低温的差异表达分析

在错误发现率(FDR)小于0.1条件下,利用DESeq分析得到349个上调表达和70个下调表达基因,差异表达基因的表达倍数均 ≥ 3.6 ,即 $|\log_2(CD/CK)| \geq 3.6$,其中CD是低温处理组的表达量,CK是室温对照组的表达量。以DESeq分析的差异

表达倍数为基础,将GFOLD软件分析的阈值设为4,得到471个上调和81个下调表达基因。在下游分析中以两种方法得到的差异性表达基因的并集作为分析对象。两种方法共得到514个上调表达基因,其中共同上调表达306个(图2:A);共得到91个下调表达基因,其中共同下调表达60个(图2:B)。

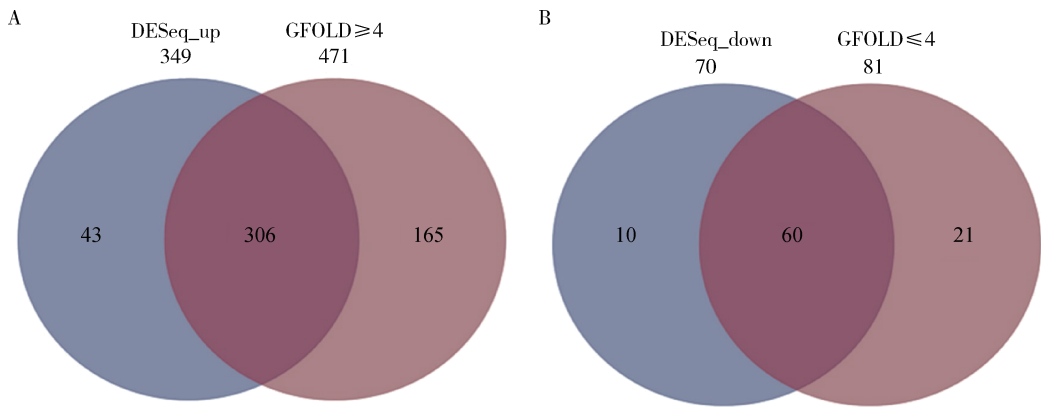


图2 DESeq和GFOLD法分析小胸鳖甲低温差异表达基因的维恩图

Fig. 2 Venn diagram of the differentially expressed unigenes in *Microdera punctipennis* transcriptome by DESeq and GFOLD analysis A: 通过两种方法共得到的514个上调表达基因,其中共同上调表达306个 In total, 514 up-regulated unigenes are obtained by using the two tools, of which 306 unigenes are common in both analyses; B: 两种方法总共得到91个下调表达基因,其中共同下调表达60个 In total, 91 down-regulated unigenes are obtained by using the two tools, of which 60 unigenes are common in both analyses.

2.4 低温胁迫后小胸鳖甲转录组上调表达基因的GO功能分类

鉴于差异表达基因较多,为了更清晰地从小胸鳖甲在低温下启动或增强的分子机制方面认识其应对低温的分子机理,利用Blast2go软件对低温响应的514个上调表达基因进行功能富集分析,涉及生物学过程、分子功能、细胞组分3大类,35个小类(图3)。富集到生物学过程的基因占绝大多数(95.72%),其次为分子功能(50.19%)、不同细胞组分(31.71%)。在生物学过程方面,以代谢过程为主(26.42%),其次为细胞过程(16.05%)和单有机体过程(15.04%),此外,胁迫响应(8.13%)、生物调节(7.11%)、免疫系统过程(5.49%)、定位(4.27%)、多有机体过程(3.86%)也都占有相当多的比例。这些结果表明,小胸鳖甲的低温响应是生物学过程的全方位响应,其中以代谢过程的改变为主。在分子功能方面,以催化活性(46.12%)和结合活性(39.53%)最为显著,两者共占85.65%,其次为结构分子活性、分子功能调节和转运活性,占12.01%。在细胞组分方面,富集到细胞的最多(31.25%),其次为胞外区域(23.31%)、细胞器(18.4%)、细胞膜(12.26%)、大分子复合物

(9.82%)等部位(图3)。

2.5 低温胁迫后小胸鳖甲转录组上调表达基因的KEGG代谢通路分析

为了获得小胸鳖甲在低温下启动或增强的代谢通路,根据各序列GO注释对应的酶代码(enzyme code, EC)分析小胸鳖甲转录组低温响应上调表达基因富集到不同代谢通路的数目,得到93个基因富集到18个代谢通路(图4),其中富集前4位的通路是嘌呤代谢、硫胺素代谢、抗生素合成、糖酵解/糖异生,基因数目均含10个以上;富集前5-10位的通路是氨基糖和核苷酸糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、果糖和甘露糖代谢、丁苷菌素和新霉素合成、半乳糖代谢。富集到其他代谢途径的基因数目均少于4个。

2.6 小胸鳖甲低温响应转录组中与非生物胁迫相关的显著上调表达基因

在胁迫响应相关GO term中,经Fisher精确检验,共得到8个与非生物胁迫相关的显著上调表达基因,分别为热激蛋白90(HSP90)、生长阻滞与DNA损伤诱导蛋白45(Gadd45 γ)、线粒体吡咯琳-5-羧酸脱氢酶(P5CDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、钙联接蛋白(calnexin)和烯醇化酶(enolase)基因等,上调表达倍数均大于4.7(表2)。

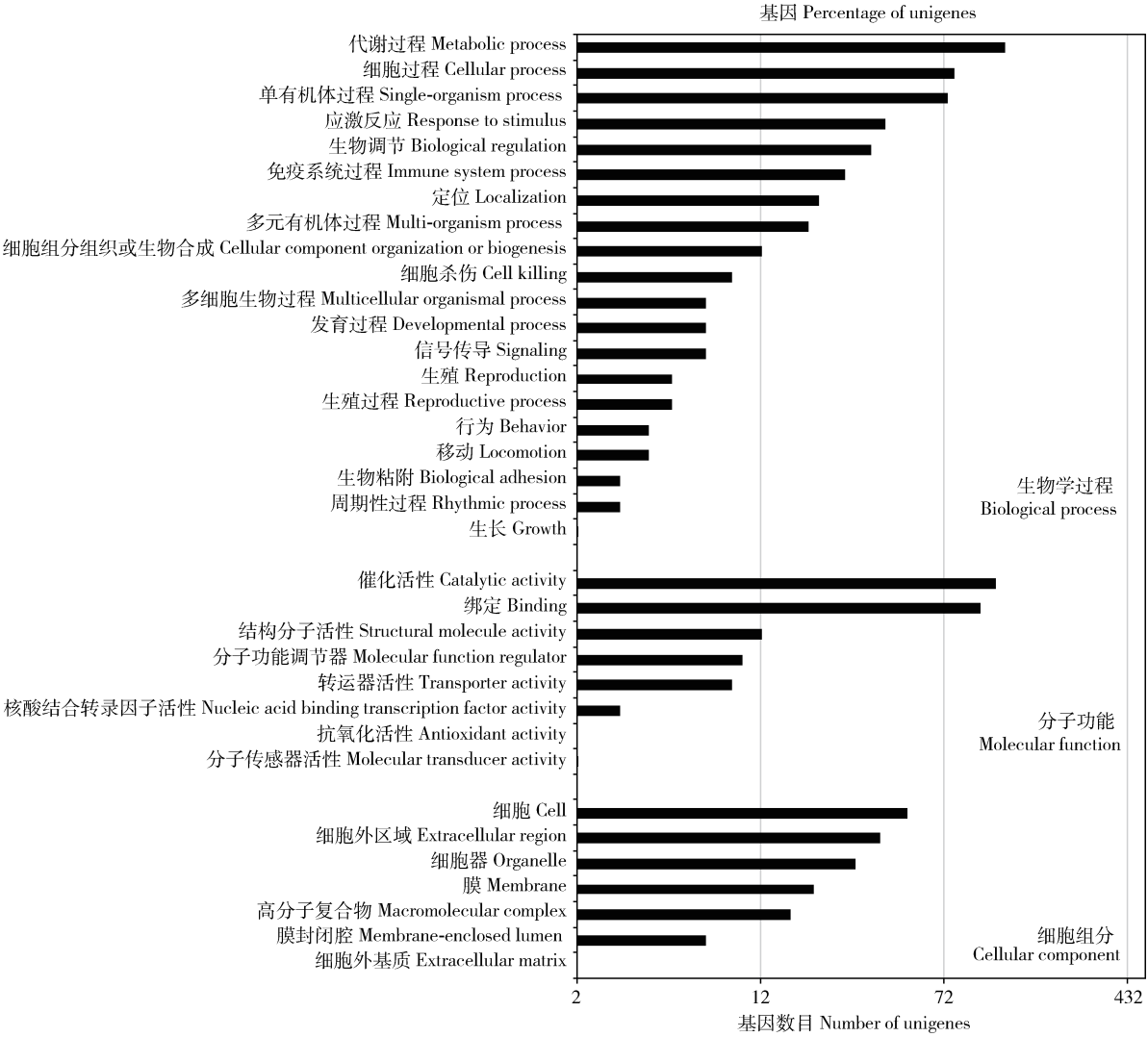


图 3 小胸鳖甲低温处理转录组上调表达基因的 GO 功能分类

Fig. 3 GO terms alignment of the up-regulated unigenes from the transcriptome of *Microdera punctipennis* at low temperature

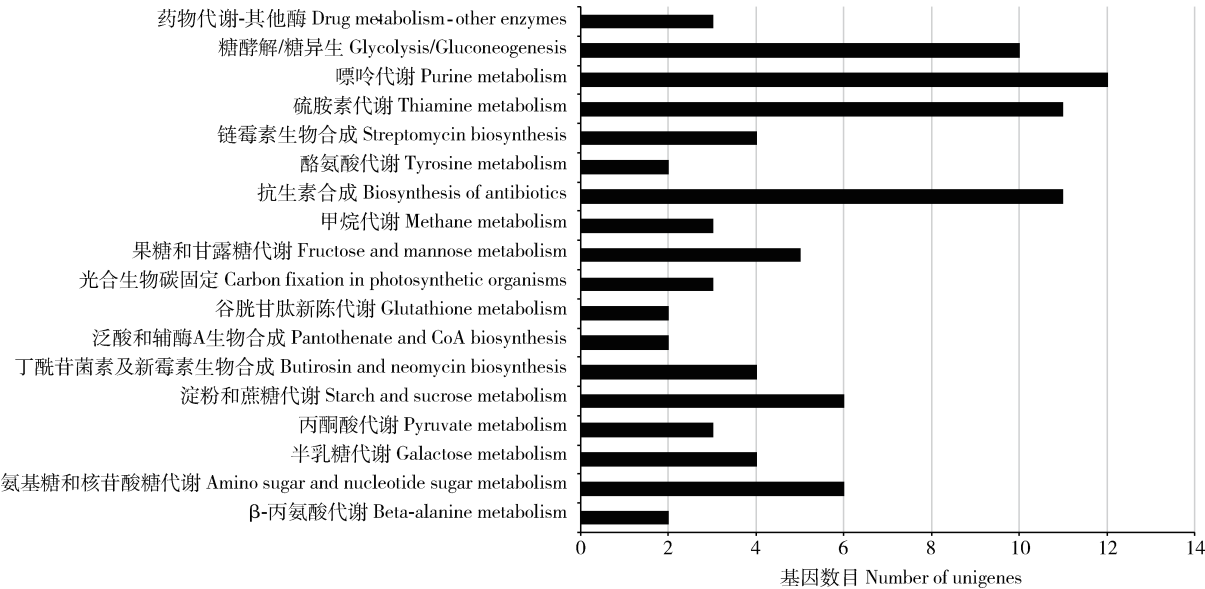


图 4 小胸鳖甲低温处理转录组上调表达基因的 KEGG 通路分析 ($P \leq 10^{-6}$)

Fig. 4 KEGG pathway analysis of the up-regulated unigenes in transcriptome of *Microdera punctipennis* at low temperature ($P \leq 10^{-6}$)

表 2 小胸鳖甲转录组中非生物胁迫响应 GO 类群上调表达基因信息

Table 2 Unigenes in the abiotic stress response GO term in <i>Microdera punctipennis</i> transcriptome			
序列 ID Sequence ID	E 值 E-value	GFOLD 值 GFOLD value	序列描述 Description
TR15619 c0_g1_i1	1.5E-25	4.94623	热激蛋白 90 Heat shock protein 90
TR27940 c1_g1_i1	7.9E-114	6.74473	热激蛋白 90 Heat shock protein 90
TR27940 c0_g1_i1	0	7.87764	Hsp90 样蛋白 Hsp90-like protein
TR25977 c1_g1_i1	6.4E-72	4.7397	生长阻滞与 DNA 损伤诱导蛋白 45 Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 gamma
TR30652 c0_g1_i1	0	5.38352	线粒体吡咯琳-5-羧酸脱氢酶 Mitochondrial P5CDH
TR5051 c0_g1_i1	2.1E-66	4.81811	超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase
TR29339 c0_g1_i1	5.4E-112	4.96651	钙联接蛋白 Calnexin
TR7914 c0_g1_i1	0	5.73647	烯醇化酶 Enolase

3 讨论

3.1 小胸鳖甲 4℃低温转录组的质量分析

生活于古尔班通古特沙漠的小胸鳖甲适应于荒漠极端温度变化,抗冻耐寒性很强,除了产生抗冻蛋白渡过严冬之外,体内还有一系列生理生化变化,涉及到大量基因的表达变化。由于冷驯化是一种可诱导响应过程,利用 RNA-seq 技术不仅可检测具有冷驯化效应的基因还可检测其他基因的表达变化,还可发现主要控制冷驯化效应的基因及响应一些二级变化的基因 (Parker *et al.*, 2015)。本研究利用 Illumina Solexa 测序平台对 4℃低温处理 3 h 的小胸鳖甲成虫及其 25℃对照组进行测序,得到 68 165 001 条有效读序,从头组装得到 56 130 条 Trinity 组装序列,利用 CD-HIT 软件去除冗余序列后,最终得到平均长度为 984 nt、N50 为 1 755 nt 的非冗余基因 51 712 条。同为拟步甲科的黄粉虫触角转录组测序得到 52 216 616 条有效读序,平均长度 451 nt, N50 为 505 nt 的基因 35 363 条 (Liu *et al.*, 2015)。从获得基因的数量、平均长度和 N50 长度等方面均显示本次小胸鳖甲转录组的拼接效果良好。研究表明,有参考序列组装的转录组敏感性高、冗余度低,并可拼接出新转录本 (Marchant *et al.*, 2016)。基因组已测序的拟步甲科的赤拟谷盗 *T. castane* 基因组大小为 210.265 Mb,含 18 076 条蛋白质 (NCBI)。与赤拟谷盗基因组信息比较,推测本次拼接的小胸鳖甲转录组可能仍存在冗余现象,但不排除可变剪接的可能性。与 NCBI 的 NR 蛋白库比对可知,小胸鳖甲转录组有 29 925 条基因与已知蛋白质序列同源,占 42.13%,表明转录组中尚有大量功能未知的新基因,这些新基因可能与昆虫独特的生物学特性和环境适应性有关。在已注释的基因中,与亲缘关系最

近的赤拟谷盗同源性达 72.75%。目前已有 23 种果蝇和 21 种蚊子等双翅目昆虫的基因序列信息,但是鞘翅目昆虫的基因序列信息不多,本次高通量测序的小胸鳖甲转录组数据将有助于推进鞘翅目昆虫的分子生物学研究。

3.2 小胸鳖甲低温转录组上调表达基因的 GO 富集

本研究利用 DESeq 分析得到 349 条上调和 70 条下调表达低温响应基因。利用 GFOLD 软件得到 471 条上调和 81 条下调表达低温响应基因,可见 GFOLD 软件的分析结果涵盖面更广泛。有研究认为 GFOLD 软件在分析非生物学重复转录组时比其他常用软件的分析结果更具生物学意义 (Feng *et al.*, 2012)。鉴于转录组分析力图获得更多差异表达基因,我们取两种方法得到的差异性表达基因的并集为分析对象,共得到 514 个上调、91 个下调表达低温响应基因。本转录组响应低温上调表达基因的 qRT-PCR 验证已在前期的部分工作中发表 (李洁琼等, 2013; Lu *et al.*, 2014a; 阮梦鸽等, 2015; 孟闪闪等, 2015)。对这些上调表达基因进行 GO 分析,可富集到 3 大类,35 个小类 (图 3)。其中富集到生物学过程类群占绝大多数 (95.72%),又以代谢过程所占比例最高,其次为细胞内过程类群和单有机体过程类群。这与昆虫在低温下首先是代谢过程发生改变是一致的 (Zhang *et al.*, 2011)。对寄生蜂 *Aphidius colemani* 蛋白质组学研究显示,温度变动可上调糖酵解、三羧酸循环、ATP 合成相关的代谢通路 (Colinet *et al.*, 2007)。脂肪和碳水化合物代谢与冷暴露的程度相关 (Zhang *et al.*, 2011)。小胸鳖甲低温转录组中胁迫响应、生物调节和免疫系统过程也都占有重要比例。在双翅目的果蝇中也发现在低温下免疫系统的多个基因上调表达 (Zhang *et al.*, 2011)。小胸鳖甲在低温下免疫系统相关基因的上调表达提示昆虫免疫与低温相关。Parker 等 (2015)

研究 5℃ 处理 6 d 的果蝇 *D. montana* 和 *D. virilis*, 发现分别有 177 条和 458 条差异表达基因, GO 富集到 16 个生物学过程。小胸鳖甲 4℃ 低温转录组所获得的上调表达基因数目和富集的 GO 类群都多于果蝇 *D. montana* 和 *D. virilis*, 这是否表明小胸鳖甲耐寒机制更为复杂还有待深入研究。

小胸鳖甲低温响应上调表达基因所富集的生物学过程与果蝇 *D. montana* 和 *D. virilis* 大体一致, 但也存在多方面不同, 表现在小胸鳖甲存在显著的单有机体过程 (占 15.04%)、免疫系统过程 (占 5.5%) 和细胞杀伤过程, 而果蝇 *D. montana* 和 *D. virilis* 的低温转录组数据缺少单有机体过程和细胞杀伤过程, 免疫系统过程也仅占 0.25%。物种间的这种显著差异值得深入研究。另一方面, 果蝇 *D. montana* 和 *D. virilis* 的低温转录组中, 发育过程类群占有较高比例 (19%), 而在小胸鳖甲, 这一类群仅占 1.4%。小胸鳖甲是荒漠耐寒性昆虫, 而果蝇为不耐寒昆虫, 它们在生物学过程类群方面的显著差异表明昆虫对低温的基因响应存在物种差异性, 即使在同属的上述两种果蝇之间也有很大不同 (Parker *et al.*, 2015)。在小胸鳖甲生物学过程的分子功能方面, 催化活性和结合活性共占 85.65%, 是十分显著的功能类群, 这与其他昆虫在低温下的分子功能分类结果类似 (Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012)。4℃ 处理的植物类番茄茄 *Solanum lycopersicoides* 转录组有 2 052 个下调和 2 409 个上调表达基因 (Chen *et al.*, 2015), 其 GO 分类与小胸鳖甲转录组在一般性生物学过程、分子功能和细胞组分的主要类群基本一致, 但是多出了诸如细胞增殖、细胞连接、类核、电子载体活性、蛋白质结合转录活性等类群, 这些在小胸鳖甲中所缺乏的 GO 类群有些是植物所特有的。而小胸鳖甲低温转录组多出了分子功能调节器和行为两个类群, 表明在动植物之间, 虽然在冷驯化响应的生物学过程、分子功能及细胞组分的类群大致相同, 但也有显著不同。冷驯化作为一种逆境适应性策略, 在生物中存在同源性状 (Salt *et al.*, 1961; Denlinger and Lee, 2010)。由于进化速度不同, 同源性和不同水平上可能不一致, 直系同源选择或漂移可导致贡献同类生物过程的基因被增选或淘汰, 使得产生同源性状的基因可能不同 (Canestro *et al.*, 2007; McCune and Schimenti, 2012)。

3.3 小胸鳖甲低温转录组上调表达基因的 KEGG 富集

KEGG 数据库是一个涉及基因组生物学途径、

疾病、药物和化学物质等数据库的集合 (Kanehisa and Goto, 2000)。小胸鳖甲低温转录组上调表达的基因可富集到 18 个 KEGG 途径, 其中嘌呤代谢、硫胺素代谢、糖酵解/糖异生、抗生素合成途径的富集程度最高。其中, 嘌呤代谢和硫胺素代谢在其他昆虫低温转录组没有发现 (Zhang *et al.*, 2011)。嘌呤代谢与能量代谢有直接关系, 昆虫在低温下首先是停止或降低与细胞分裂、组织分化和生长相关的主要能量消耗过程 (Denlinger and Lee, 2010)。在麻蝇 *S. bullata* 低温转录组中糖酵解/糖异生也具有显著富集的 KEGG 通路 (Teets *et al.*, 2012), 该通路与碳水化合物代谢直接相关, 提示在冷驯化过程中, 有氧代谢转换为糖异生/糖酵解, 进而启动合成碳水化合物类低温保护剂 (Colinet *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011)。而硫胺素代谢也与糖代谢相关 (Beltramo *et al.*, 2008), 可能也参与碳水化合物类低温保护剂代谢。硫胺素代谢在小胸鳖甲低温适应性中的作用有待深入研究。在富集前 5–10 位的通路中还有氨基糖和核苷酸糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、果糖和甘露糖代谢, 反映了在小胸鳖甲低温响应过程中, 短时间内就可启动大分子碳水化合物的降解和小分子糖类物质的合成, 从而维持细胞的渗透平衡。在红尾肉蝇 *S. crassipalpis* (Michaud and Denlinger, 2007) 和黑腹果蝇 (Overgaard *et al.*, 2007) 中也观察到了类似情况, 提示葡萄糖的产生可能是冷驯化的一般性特征 (Teets *et al.*, 2012)。此外, 小胸鳖甲中氨基酸代谢、丙酮酸代谢也都有较高的富集度。在麻蝇 *S. bullata* 低温转录组中发现氨基酸代谢通路基因表达显著上调, 并且几乎所有的氨基酸含量都有增加, 推测可能与冷损伤修复有关 (Teets *et al.*, 2012)。值得注意的是, 小胸鳖甲冷响应上调表达基因还富集到了抗生素生物合成途径, 这也是与其他昆虫低温转录组的不同之处。利用 UniProt 数据库比对, 结果显示, 除了基因 TR7914|c0_g1_i1 和 TR16785|c0_g2_i4 之外, 小胸鳖甲 KEGG 抗生素生物合成途径的其他高度同源序列基因均分布于寄生虫中。昆虫与微生物共生现象比较普遍 (Li *et al.*, 2012), 推测荒漠昆虫小胸鳖甲体内可能有寄生或共生生物, 它们通过产生一些抗菌物质而保护自身及其寄主在低温下不受其他微生物的攻击。小胸鳖甲与共生生物如何在低温下的协同作用也是一个值得研究的领域。

3.4 小胸鳖甲低温转录组中的非生物胁迫响应基因

在胁迫响应相关 GO term 中, 有 8 个显著上调

表达的非生物胁迫相关基因,包括 3 个热激蛋白 90 (Hsp90) 基因,以及生长阻滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45 (Gadd45 γ)、吡咯啉-5-羧酸脱氢酶 (P5CDh)、超氧化物歧化酶 (SOD)、钙联接蛋白和烯醇化酶基因。从功能分析来看,这些基因可能从分子伴侣、细胞周期阻滞、线粒体稳定性、抗氧化胁迫等方面应对低温胁迫。热激蛋白 (heat shock protein, HSP) 是生物响应环境胁迫时体内合成的一类蛋白质,起分子伴侣作用,防止其他蛋白质错误折叠和聚集,还参与蛋白质跨膜运输。小胸鳖甲在 4℃ 处理 3 h 的转录组中有 3 个 Hsp90 基因显著上调表达 (GFOLD 值 > 4.9),表明其 Hsp90 对冷驯化温度很敏感。低温刺激时,不同物种 Hsp 的响应方式有较大差异,黑腹果蝇在 -4℃ 处理 30 min 后,其 Hsp90 无差异性表达,而安第斯果蝇 *D. gaucha* 的 Hsp90 上调表达 (Boher *et al.*, 2012)。福寿螺 *Pomacea canaliculata* 在低温下 Hsp70 的表达没有发生变化 (Zheng *et al.*, 2012),但海扇贝 *Placopecten magellanicus* 的低温处理引起 Hsp70 的显著上调表达 (Brun *et al.*, 2008)。我们在小胸鳖甲低温响应转录组中还发现 4 条 Hsp70 转录本上调表达 (GFOLD 值 > 5.7),表明小胸鳖甲的 Hsp70 和 Hsp90 基因都响应低温胁迫。钙联接蛋白 (calnexin) 也是一种分子伴侣,在内质网中与钙网蛋白 (calreticulin) 一起参与质量控制过程,即只允许正确折叠和组装的蛋白质通过内质网的分泌通道。小胸鳖甲转录组中钙联接蛋白基因呈显著性上调表达 (GFOLD 值 = 4.966),表明小胸鳖甲在低温下能够对合成的蛋白质进行精细质量调控,从而保证新合成蛋白质的质量 (Hammond *et al.*, 1994)。生长阻滞与 DNA 损伤诱导蛋白 45 γ (Gadd45 γ) 主要参与细胞周期阻滞、DNA 损伤修复、促进细胞凋亡等功能 (Lucas *et al.*, 2015)。其在小胸鳖甲低温转录组中显著上调表达,与低温下昆虫的生长活动受抑制现象是一致的。昆虫在低温下也存在细胞凋亡现象 (Yi *et al.*, 2007),小胸鳖甲是否存在细胞凋亡、Gadd45 γ 在低温下的具体功能有待深入研究。此外,昆虫在低温下,能量代谢受到抑制,虽然吡咯啉-5-羧酸脱氢酶 P5CDh 的主要功能是催化脯氨酸降解的第 2 步以及降解精氨酸为谷氨酸 (Dendinger and Brill, 1970),但其在维持果蝇线粒体形态及其内环境稳定性方面的功能 (He and DiMario, 2011),提示在低温下小胸鳖甲 P5CDh 可能参与线粒体稳定性。P5CDh 的表达响应低温的研究尚未见报道,该基因与低温响应的关系及其功

能有待深入研究。此外,小胸鳖甲低温转录组中 SOD 基因的上调表达,表明其耐寒机制也包含抗氧化胁迫。由于昆虫在低温下代谢活动降低,细胞内会产生大量活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS),这些 ROS 分子会对生物大分子造成氧化损伤 (Dalton *et al.*, 2009)。超氧化物歧化酶 (SOD) 能够催化超氧化物自由基形成过氧化氢,后者再由过氧化氢酶和过氧化物酶催化产生水和氧气 (Fridovich, 1977),从而解除对生物大分子的过氧化胁迫。小胸鳖甲成虫低温响应转录组中, SOD 基因显著上调表达 (GFOLD 值 = 4.818),表明抗氧化是小胸鳖甲低温冷驯化响应的机制之一。我们在前期研究发现,小胸鳖甲在 4℃ 及 -4℃ 处理时成虫体内 SOD 的 mRNA 水平上升,外源表达小胸鳖甲 SOD 在低温条件下可赋予大肠杆菌 *Escherichia coli* 和酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 细胞一定的抗冻性 (肖荣, 2014)。果蝇在低温胁迫时 SOD 基因也显著性上调表达并且 SOD 酶活性增高 (Gao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014),这与小胸鳖甲是一致的。另外,烯醇化酶 (enolase) 是一种多功能蛋白,除了作为糖酵解酶之外,还是纤维蛋白溶酶原结合蛋白,参与寄生虫在宿主体内的侵染和转移过程。寄生虫的卵浆膜可产生烯醇化酶,在卵周围富集纤维蛋白溶酶原,破坏寄主胞外基质并抑制宿主免疫功能,协助寄生虫逃避宿主的免疫攻击 (Falabella *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2013)。小胸鳖甲低温响应转录组数据中烯醇化酶基因显著上调表达 (GFOLD 值 = 5.73647)。通过 GO 富集分析结果可知该序列富集到细胞组分大类的卵绒毛膜类群。与 NCBI 和 SWISS-PROT 数据库比对结果显示,小胸鳖甲转录组低温响应上调表达的烯醇化酶可能来自其体内的寄生虫。

本研究应用 RNA-Seq 技术对荒漠昆虫小胸鳖甲进行了高通量转录组测序分析,共得到 68 165 001 有效条读序,从头组装获得平均长度为 984 bp 的 51 712 条非冗余基因。其中 29 925 条 (约 57.87%) 与已知蛋白质有同源性。514 条低温响应上调表达基因富集到 35 个 GO 类群,18 个 KEGG 代谢通路。其中显著的 GO 类群及 KEGG 通路与其他昆虫及植物相比都有一定程度的差异。在非生物胁迫相关 GO 类群中,有 8 个基因显著上调表达,包括 3 个热激蛋白 90 (Hsp90) 基因,以及生长阻滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45 (Gadd45 γ)、吡咯啉-5-羧酸脱氢酶 (P5CDh)、超氧化物歧化酶 (SOD)、钙联蛋白和烯

醇化酶基因。表明小胸鳖甲可能从分子伴侣、细胞周期阻滞、线粒体稳定性、抗氧化胁迫等方面应对低温胁迫。该结果为描绘小胸鳖甲的低温转录组图谱及进一步探析小胸鳖甲的耐寒性提供了基础,为深入研究荒漠昆虫的耐寒性分子机制及挖掘潜在的新基因提供了丰富数据,对进一步研究该物种响应低温胁迫机制可提供新的见解。

参考文献 (References)

- Andersen JL, Macmillan HA, Overgaard J, 2015. Temperate *Drosophila* preserve cardiac function at low temperature. *J. Insect Physiol.*, 77: 26–32.
- Bale JS, Hayward SAL, 2010. Insect overwintering in a changing climate. *J. Exp. Biol.*, 213(6): 980–994.
- Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, Porta M, 2008. Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications. *Acta Diabetol.*, 45(3): 131–141.
- Boher F, Trefault N, Piulachs MD, Bellés X, Godoy-Herrera R, Bozinovic F, 2012. Biogeographic origin and thermal acclimation interact to determine survival and hsp90 expression in *Drosophila* species submitted to thermal stress. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 162: 391–396.
- Brun NT, Bricelj VM, MacRae TH, Ross NW, 2008. Heat shock protein responses in thermally stressed bay scallops, *Argopecten irradians*, and sea scallops, *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 358(2): 151–162.
- Canestro C, Yokoi H, Postlethwait JH, 2007. Evolutionary developmental biology and genomics. *Nat. Rev. Genet.*, 8(12): 932–942.
- Chen HY, Chen XL, Chai XF, Qiu YW, Gong C, Zhang ZZ, Wang TT, Zhang Y, Li JF, Wang AX, 2015. Effects of low temperature on mRNA and small RNA transcriptomes in *Solanum lycopersicoides* leaf revealed by RNA-Seq. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 464(3): 768–773.
- Chown SL, Nicolson SW, 2004. Insect Physiological Ecology. Oxford University Press, New York. 1–10.
- Colinet H, Nguyen TT, Cloutier C, Michaud D, Hance T, 2007. Proteomic profiling of a parasitic wasp exposed to constant and fluctuating cold exposure. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(11): 1177–1188.
- Dalton TP, Shertzer HG, Puga A, 2009. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39(1): 67–101.
- Dendinger S, Brill WJ, 1970. Regulation of proline degradation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 103(1): 144–152.
- Denlinger DL, Lee RE, 2010. Low Temperature Biology of Insects. Cambridge University Press, New York. 141–161, 191–212.
- Dunning LT, Dennis AB, Park D, Sinclair BJ, Newcomb RD, Buckley TR, 2013. Identification of cold-responsive genes in a New Zealand alpine stick insect using RNA-Seq. *Comp. Biochem. Physiol. D Genom. Proteom.*, 8(1): 24–31.
- Falabella P, Riviello L, De Stradis ML, Stigliano C, Varricchio P, Grimaldi A, de Eguileor M, Graziani F, Gigliotti S, Pennacchio F, 2009. *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(11): 801–813.
- Feng J, Meyer CA, Wang Q, Liu JS, Shirley Liu X, Zhang Y, 2012. GFOLD: a generalized fold change for ranking differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 28(21): 2782–2788.
- Fridovich I, 1977. Oxygen is toxic! *BioScience*, 27: 462–466.
- Gao XM, Jia FX, Shen GM, Jiang HQ, Dou W, Wang JJ, 2013. Involvement of superoxide dismutase in oxidative stress in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*: molecular cloning and expression profiles. *Pest Manag. Sci.*, 69(12): 1315–1325.
- Hammond C, Braakman I, Helenius A, 1994. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(3): 913–917.
- Harrison JF, Woods HA, Roberts SP, 2012. Ecological and Environmental Physiology of Insects. Oxford University Press, New York. 1–15.
- He F, DiMario PJ, 2011. *Drosophila* delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (P5CDh) is required for proline breakdown and mitochondrial integrity-establishing a fly model for human type II hyperprolinemia. *Mitochondrion*, 11(3): 397–404.
- Hou F, Ma J, Liu X, Liu XN, Zhang FC, 2010. Seasonal changes in antifreeze protein gene transcription and water content of beetle *Microdera punctipennis* (Coleoptera: Tenebrionidae) from Gurbantonggut Desert in Central Asia. *Cryoletters*, 31(5): 359–370.
- Huang RX, Wu W, Mao XF, Hu HY, Fan ZT, Hou YJ, Li XP, Du CH, Shao HG, Huang X, Ouyang T, 2005. The Fauna of the Desert Insects of Xinjiang and Its Formation and Evolution. Xinjiang Science and Technology Publishing House, Urumqi. 36–46. [黄人鑫, 吴卫, 毛新芳, 胡红英, 范兆田, 侯艳君, 李新平, 杜春华, 邵红光, 黄翔, 欧阳彤, 2005. 新疆荒漠昆虫区系及其行程与演变. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社. 36–46]
- Kanehisa M, Goto S, 2000. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.*, 28(1): 27–30.
- Leather SR, Walters KFA, Bale JS, 1993. The Ecology of Insect Overwintering. Cambridge University Press, Cambridge. 129–137.
- Li XQ, Guo WF, Ding JQ, 2012. Mycangial fungus benefits the development of a leaf-rolling weevil, *Euops chinensis*. *J. Insect Physiol.*, 58(6): 867–873.
- Li JQ, Lu XY, Liu XN, Ma J, 2013. Cloning and expression profiling of an attacin gene in response to cold stress in the desert beetle *Microdera punctipennis* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(12): 1381–1390. [李洁琼, 陆雪莹, 刘小宁, 马纪, 2013. 荒漠昆虫小胸鳖甲抗菌肽 Attacin 基因的克隆及低温表达模式分析. 昆虫学报, 56(12): 1381–1390]
- Liu S, Rao XJ, Li MY, Feng MF, He MZ, Li SG, 2015. Identification of candidate chemosensory genes in the antennal transcriptome of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp. Biochem. Physiol. D Genom. Proteom.*, 13: 44–51.
- Lu XY, Li JQ, Liu XN, Li XB, Ma J, 2014a. Characterization and expression analysis of six chitinase genes from the desert beetle *Microdera punctipennis* in response to low temperature. *Cryoletters*, 35(5): 438–448.
- Lu XY, Li JQ, Yang JH, Liu XN, Ma J, 2014b. De novo transcriptome of the desert beetle *Microdera punctipennis* (Coleoptera:

- Tenebrionidae) using Illumina RNA-seq technology. *Mol. Biol. Rep.*, 41(11): 7293–7303.
- Lucas A, Mialet-Perez J, Daviaud D, Parini A, Marber MS, Sicard P, 2015. Gadd45 γ regulates cardiomyocyte death and post-myocardial infarction left ventricular remodeling. *Cardiovasc. Res.*, 108(2): 254–267.
- MacMillan HA, Andersen JL, Davies SA, Overgaard J, 2015. The capacity to maintain ion and water homeostasis underlies interspecific variation in *Drosophila* cold tolerance. *Sci. Rep.*, 5: 18607.
- Marchant A, Mougel F, Mendonça V, Quartier M, Jacquin-Joly E, da Rosa JA, Petit E, Harry M, 2016. Comparing *de novo* and reference-based transcriptome assembly strategies by applying them to the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 69: 25–33.
- McCune AR, Schimenti JC, 2012. Using genetic networks and homology to understand the evolution of phenotypic traits. *Curr. Genomics*, 13(1): 74–84.
- Meng SS, Li JQ, Ruan MG, Lu XY, Ma J, 2015. Cloning and expression analysis of extracellular signal-regulated kinase ERK gene from the desert beetle *Microdera punctipennis*. *Journal of Environmental Entomology*, 37(5): 987–995. [孟闪闪, 李洁琼, 阮梦鸽, 陆雪莹, 马纪, 2015. 荒漠甲虫小胸鳖甲胞外信号调节激酶 ERK 基因的克隆与低温表达谱分析. 环境昆虫学报, 37(5): 987–995]
- Michaud MR, Denlinger DL, 2007. Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. *J. Comp. Physiol. B*, 177(7): 753–763.
- Nguyen TT, Magnoli I, Cloutier C, Michaud D, Muratori F, Hance T, 2013. Early presence of an enolase in the oviposition injecta of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* analyzed with chitosan beads as artificial hosts. *J. Insect Physiol.*, 59(1): 11–18.
- Overgaard J, Malmendal A, Sorensen JG, Bundy JG, Loeschcke V, Nielsen NC, Holmstrup M, 2007. Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, 53(12): 1218–1232.
- Parker DJ, Vesala L, Ritchie MG, Laiho A, Hoikkala A, Kankare M, 2015. How consistent are the transcriptome changes associated with cold acclimation in two species of the *Drosophila virilis* group? *Heredity (Edinb)*, 115(1): 13–21.
- Qin W, Neal SJ, Robertson RM, Westwood JT, Walker VK, 2005. Cold hardening and transcriptional change in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.*, 14(6): 607–613.
- Rinehart JP, Li AQ, Yocum GD, Robich RM, Hayward SAL, Denlinger DL, 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(27): 11130–11137.
- Robich RM, Rinehart JP, Kitchen LJ, Denlinger DL, 2007. Diapause-specific gene expression in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L., identified by suppressive subtractive hybridization. *J. Insect Physiol.*, 53(3): 235–245.
- Ruan MG, LI JQ, Meng SS, Ma J, 2015. Cloning and expression profiling in response to low temperature of Ras GTPase-activating protein gene *MpRasGAP* in the desert beetle *Microdera punctipennis* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(4): 367–374. [阮梦鸽, 李洁琼, 孟闪闪, 马纪, 2015. 荒漠昆虫小胸鳖甲 Ras GTP 酶激活蛋白基因 *MpRasGAP* 的克隆及低温表达分析. 昆虫学报, 58(4): 367–374]
- Salt RW, 1961. Principles of insect cold-hardiness. *Annu. Rev. Entomol.*, 6: 55–74.
- Sømme L, 1995. Invertebrates in Hot and Cold Arid Environments. Springer, Berlin. 1–7.
- Teets NM, Peyton JT, Ragland GJ, Colinet H, Renault D, Hahn DA, Denlinger DL, 2012. Combined transcriptomic and metabolomic approach uncovers molecular mechanisms of cold tolerance in a temperate flesh fly. *Physiol. Genomics*, 44(15): 764–777.
- Wang JH, Zeng L, Han ZJ, 2014. An assessment of cold hardiness and biochemical adaptations for cold tolerance among different geographic populations of the *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in China. *J. Insect. Sci.*, 14: 292.
- Wang XC, Zhao QY, Ma CL, Zhang ZH, Cao HL, Kong YM, Yue C, Hao XY, Chen L, Ma JQ, Jin JQ, Li X, Yang YJ, 2013. Global transcriptome profiles of *Camellia sinensis* during cold acclimation. *BMC Genomics*, 14(1): 415.
- Xiao R, 2014. Low Temperature Response of a Superoxide Dismutase Gene (SOD) from the Desert Insect *Microdera punctipennis* and Its Function in Cold Tolerance. MSc Thesis, Xinjiang University, Urumqi. [肖荣, 2014. 荒漠昆虫小胸鳖甲抗氧化酶基因(SOD)对低温的响应及其耐寒功能研究. 乌鲁木齐: 新疆大学硕士学位论文]
- Yi SX, Moore CW, Lee RE Jr, 2007. Rapid cold-hardening protects *Drosophila melanogaster* from cold-induced apoptosis. *Apoptosis*, 12(7): 1183–1193.
- Yu SH, Yang P, Sun T, Qi Q, Wang XQ, Chen XM, Feng Y, Liu BW, 2016. Transcriptomic and proteomic analyses on the supercooling ability and mining of antifreeze proteins of the Chinese white wax scale insect. *Insect Sci.*, 23(3): 430–437.
- Zhang J, Marshall KE, Westwood JT, Clark MS, Sinclair BJ, 2011. Divergent transcriptomic responses to repeated and single cold exposures in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.*, 214(23): 4021–4029.
- Zhang YH, Jiang RX, Wu H, Liu P, Xie J, He Y, Pang H, 2012. Next-generation sequencing-based transcriptome analysis of *Cryptolaemus montrouzieri* under insecticide stress reveals resistance-relevant genes in ladybirds. *Genomics*, 100(1): 35–41.
- Zheng GW, Dong SZ, Hou Y, Yang K, Yu XP, 2012. Molecular characteristics of HSC70 gene and its expression in the golden apple snails, *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *Aquaculture*, 358–359: 41–49.
- Zhou HF, Zhou BJ, Tang Y, Dai Q, Wang DQ, 2009. Experimental study on infiltration characteristics of seasonal frozen soils in Gurbantunggut Desert. *Arid Land Geography*, 32(4): 532–536. [周宏飞, 周宝佳, 汤英, 代琼, 王大庆, 2009. 古尔班通古特沙漠季节性冻土入渗特性试验研究. 干旱区地理, 32(4): 532–536]
- Zhu JY, Zhao N, Yang B, 2012. Global transcriptome profiling of the pine shoot beetle, *Tomicus yunnanensis* (Coleoptera: Scolytinae). *PLoS ONE*, 7(2): e32291.